

学校编码: 10384

密级_____

学号: 22420061152302

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

中国东南近海条纹斑竹鲨的群体遗传结构
研究

Studies on Population Genetic Structure of
Chiloscyllium plagiosum in the neritic
waters of Southeastern China

傅蒙娜

指导教师姓名: 王 军 教 授

专业名称: 海洋生物学

论文提交日期: 2009 年 9 月

论文答辩日期: 2009 年 9 月

2009 年 9 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费的资助,在()实验室完成。

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

- ☐ 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。
- ☒ 2.不保密，适用上述授权。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博士论文摘要库

目录

| | |
|-------------------------------------|-----|
| 摘 要 | V |
| ABSTRACT..... | VII |
| 第一章 文献综述 | 1 |
| 1. 鱼类遗传多样性研究 | 1 |
| 1.1 遗传多样性的含义及重要意义..... | 1 |
| 1.2 遗传多样性的研究方法..... | 2 |
| 2. 鱼类线粒体基因的结构及研究进展 | 6 |
| 2.1 线粒体结构..... | 6 |
| 2.2 线粒体 DNA 的特点 | 8 |
| 2.3 鱼类线粒体基因研究方法..... | 12 |
| 2.4 线粒体基因在鱼类群体遗传学研究中的应用..... | 12 |
| 3. 分子系统学的研究进展 | 19 |
| 3.1 分子系统地理学的含义..... | 19 |
| 3.2 分子系统地理学的研究内容及方法..... | 20 |
| 3.3 分子系统地理学的应用领域..... | 21 |
| 4. 条纹斑竹鲨简介 | 22 |
| 5. 本研究的目的意义 | 25 |
| 第二章 材料与方法 | 27 |
| 1. 实验材料 | 27 |
| 1.1 样品采集..... | 27 |
| 1.2 药品及器材..... | 27 |
| 2. 实验方法 | 28 |
| 2.1 DNA 提取 | 29 |
| 2.2 目的 DNA 片段的扩增 | 29 |
| 2.3 产物的纯化及测序..... | 30 |
| 2.4 数据处理..... | 31 |
| 第三章 实验结果与分析 | 32 |
| 1. 基因组提取情况及 cyt b 和控制区序列的扩增情况 | 32 |
| 2. 基于细胞色素 b 基因的条纹斑竹鲨群体遗传结构 | 33 |
| 2.1 条纹斑竹鲨细胞色素 b 基因的序列变异..... | 33 |

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| 2.2 群体内的遗传结构分析..... | 41 |
| 2.3 群体间的遗传结构分析..... | 44 |
| 3. 基于控制区序列研究条纹斑竹鲨的群体遗传结构 | 48 |
| 3.1 条纹斑竹鲨控制区的序列变异..... | 48 |
| 3.2 群体内的遗传结构分析..... | 50 |
| 3.3 群体间的遗传结构分析..... | 53 |
| 第四章 讨论 | 57 |
| 1. 条纹斑竹鲨群体内的遗传多样性 | 57 |
| 1.1 条纹斑竹鲨细胞色素 b 和控制区序列的变异..... | 57 |
| 1.2 条纹斑竹鲨的遗传多样性分析..... | 58 |
| 1.3 条纹斑竹鲨群体内的遗传分化及形成历史..... | 61 |
| 2. 条纹斑竹鲨群体间的遗传结构和遗传分化 | 65 |
| 2.1 条纹斑竹鲨群体间遗传分化和地理距离的关系..... | 65 |
| 2.2 生存环境对条纹斑竹鲨群体遗传分化的影响..... | 67 |
| 2.3 条纹斑竹鲨群体间分化历史追溯..... | 68 |
| 3.小结..... | 69 |
| 参考文献 | 71 |
| 致 谢 | 82 |

CONTENTS

| | |
|--|------------|
| ABSTRACT IN CHINESE | V |
| ABSTRACT IN ENGLISH..... | VII |
| CHAPTER 1 REVIEW | 1 |
| Section 1 Reserch of Genetic diversity | 1 |
| 1.1 Definition and Significance of Genetic diversity..... | 1 |
| 1.2 Research methods of Genetic diversity..... | 2 |
| Section 2 Structure and Research Development of fish Mitochondrial genome | 6 |
| 2.1 Structure of Mitochondrial genome | 6 |
| 2.2 Genetic features of mitochondrial DNA | 8 |
| 2.3 Research methods of fish Mitochondrial genome | 12 |
| 2.4 Application of mtDNA in Population Genetic research of fish | 12 |
| Section 3 Research Development of Molecular phylogeography | 19 |
| 3.1 Definition of Molecular phylogeography | 19 |
| 3.2 Content and Research methods of Molecular phylogeography | 20 |
| 3.3 Application field of Molecular phylogeography | 21 |
| Section 4 Introduction of <i>Chiloscyllium plagiosum</i> | 22 |
| Section 5 Purpose and significance of the research | 25 |
| CHAPTER 2 MATERIALS AND METHODS | 27 |
| Section 1 Materials | 27 |
| 1.1 Sample collection..... | 27 |
| 1.2 Reagent and apparatus | 27 |
| Section 2 Methods..... | 28 |
| 2.1 Methods of DNA extraction..... | 29 |
| 2.2 PCR amplification..... | 39 |
| 2.3 Purification of PCR products and Sequencing..... | 30 |
| 2.4 Data analysis | 31 |
| CHAPTER 3 RESULTS AND ANALYSIS..... | 32 |
| Section 1 Results of DNA extraction and PCR amplification | 32 |
| Section 2 Research of population genetic structrue of <i>Chiloscyllium plagiosum</i> based on cyt b | 33 |
| 2.1 Variations of <i>Chiloscyllium plagiosum</i> cyt b Sequences | 33 |
| 2.2 Analysis of genetic structrue within <i>Chiloscyllium plagiosum</i> groups | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3 Analysis of genetic structure among <i>Chiloscyllium plagiosum</i> groups | 44 |
| Section 3 Research of population genetic structure of <i>Chiloscyllium plagiosum</i> based on control region | 48 |
| 3.1 Variations of <i>Chiloscyllium plagiosum</i> control region Sequences | 48 |
| 3.2 Analysis of genetic structure within <i>Chiloscyllium plagiosum</i> groups | 50 |
| 3.3 Analysis of genetic structure among <i>Chiloscyllium plagiosum</i> groups | 53 |
| CHAPTER 4 DISCUSSION | 57 |
| Section 1 Genetic diversity within <i>Chiloscyllium plagiosum</i> groups | 57 |
| 1.1 Variations of <i>Chiloscyllium plagiosum</i> cyt <i>b</i> and control region Sequences .. | 57 |
| 1.2 Genetic diversity of <i>Chiloscyllium plagiosum</i> | 58 |
| 1.3 Genetic differentiation of <i>Chiloscyllium plagiosum</i> within groups and history of <i>Chiloscyllium plagiosum</i> genetic differentiation within groups | 61 |
| Section 2 Genetic structure and genetic differentiation of <i>Chiloscyllium plagiosum</i> among groups | 65 |
| 2.1 Relationship between genetic differentiation of <i>Chiloscyllium plagiosum</i> groups and geographical distance | 65 |
| 2.2 Impacts of Living environment upon <i>Chiloscyllium plagiosum</i> genetic differentiation among groups | 67 |
| 2.3 History of <i>Chiloscyllium plagiosum</i> genetic differentiation among groups ... | 68 |
| Section 3 Conclusion | 69 |
| REFERENCES | 71 |
| ACKNOWLEDGEMENTS | 82 |

摘 要

本文通过设计引物进行 PCR 扩增并测序, 获得并分析条纹斑竹鲨 (*Chiloscyllium plagiosum*, Bennett) 的线粒体基因组(mtDNA) 中细胞色素 *b* 基因 (*cyt b*) 及控制区(control region) 基因的全序列, 探讨了条纹斑竹鲨琼海、湛江、厦门、平潭 4 个群体的遗传结构特点和群体分化, 主要结果如下:

1. 条纹斑竹鲨 mtDNA 的 *cytb* 全序列长度为 1146 bp。共发现 20 个变异位点, 变异主要发生在三联密码子的第三个碱基上, 在碱基组成上呈现显著的反 G 偏倚, 在密码子使用上也存在明显偏倚性。各地理群体的起始密码子均相同为标准起始密码子 ATG; 终止密码子的使用也相同。各个地理群体之间在密码子第一和第三位的碱基含量略有不同, 但是在密码子的第二位, 各碱基含量固定。共确定了 23 种单倍型, 4 个群体的共享单倍型只有 1 个。平潭群体的单倍型较其它 3 个群体丰富, 其单倍型多样指数和核苷酸多样性最高($h=0.75132$, $\pi=0.00277$)。

2. 条纹斑竹鲨 mtDNA 的控制区全序列长度为 1077-1079 bp。共发现 7 个变异位点, 2 个插入/缺失位点。碱基组成在群体间基本维持稳定, 也表现出很强的反 G 偏倚。共确定了 11 种单倍型, 4 个群体的共享单倍型 2 个, 琼海群体的单倍型最为丰富, 其单倍型多样指数最高($h=0.639$), 群体内核苷酸多样性指数最大($\pi=0.00078$)。

3. 结合 *cytb* 和控制区序列数据, 分析了 4 个群体的遗传结构和遗传分化。结果表明: (1) 条纹斑竹鲨的遗传多样性较低, 推测是第四纪冰期使条纹斑竹鲨群体经历瓶颈效应及现代人为捕捞, 污染等因素所致。琼海和平潭群体显示了较高的遗传多样性, 群体内出现了较大的遗传分化。遗传多样性分析、中性检验结果、单倍型网络图及核苷酸不配对分析均显示条纹斑竹鲨群体可能在进化过程中存在快速的扩张过程, 且目前的进化可能正逐渐偏离中性模式。(2) 通过分子变异分析(AMOVA)方法估算, 4 个地理群体间存在着显著的遗传分化($P<0.01$), 但是地理距离较近的两两群体间遗传分化不显著($P>0.05$), 而距离较远的群体间分化显著($P<0.01$)。4 个地理种群的基因流和遗传距离计算结果均表明群体间的分化程度很低, 单倍型网络图和邻接关系树共同显示条纹斑竹鲨并没有按地理分布

形成明显的族群，说明条纹斑竹鲨不同地理群体间的分化较小，空间距离是导致遗传分化的主要因素。(3)通过绘制单倍型网络图显示现有的分布群体可能是由 2 个祖先群体经过迁移后形成。厦门群体在进化过程中有逐渐分化出独有的遗传特征的趋势。湛江群体在进化过程中丧失了部分遗传多样性，提示应重视对该海域条纹斑竹鲨的保护。(4)群体的分化适合距离隔离模型。可将琼海和湛江群体归于 1 个地理单元，厦门和平潭群体则为另 1 个地理单元进行管理。

关键词：条纹斑竹鲨；线粒体 DNA；群体遗传学

Abstract

Population genetic structure of 4 groups of *Chiloscyllium plagiosum* (Zhanjiang, Xiamen, Qionghai, Pingtan) from neritic waters of Southeastern China was investigated by molecular analysis of Cytochrome *b* (cyt *b*) and control region complete sequences in mitochondrial DNA. The main results are shown as follows:

1. The length of cyt *b* is 1146 bp. There are 20 variance loci in all cyt *b* sequences of 118 individuals. The nucleotide composition shows a nucleotide bias against G and the usage bias of codons. 4 groups share the same initiation codons and termination codons, ATG and TAG, respectively. The content of nucleotide at the first and the third loci of codons changed a little among geographical groups, while it's fixed at the second loci. 23 haplotypes were obtained, and only one haplotype was shared by all groups. The nucleotide diversity of 4 groups ranged from 0.00150 to 0.00277. The haplotype diversity of 4 groups ranged from 0.51815 to 0.75132. Pingtan group reveal the most haplotypes and the highest genetic diversity ($h=0.75132$; $\pi=0.00277$).

2. The length of control region is 1077~1079 bp. There are 7 variance loci and 2 insert/miss loci in control region sequences of all 118 individuals. The content of nucleotides were fixed among groups. The nucleotide composition shows a nucleotide bias against G. 11 haplotypes were obtained, and two haplotypes were shared by all groups. The nucleotide diversity of 4 groups ranged from 0.00048 to 0.00078. The haplotype diversity of 4 groups ranged from 0.50529 to 0.65057. Qionghai group reveal the most haplotypes and the highest genetic diversity among the 4 groups ($h=0.65057$; $\pi=0.00078$).

3. The results of genetic structure and genetic differentiation by analysing cyt *b* and control region sequences showed that: (1) The genetic diversity of *Chiloscyllium plagiosum* was low, hypothesize the ancestors of *Chiloscyllium plagiosum* suffered the bottleneck-effect in Pleistocene and the *Chiloscyllium plagiosum* existent condition and breeding is impacted by fishery and pollution in the modern times. Qionghai and Pingtan groups shows the highest genetic diversity among 4 groups and highest differentiation within groups. The results of genetic diversity analysis, neutral test, haplotype network and mismatch distribution analysis show that sudden expansion

might had happend in the evolution of *Chiloscyllium plagiosum*. (2) The AMOVA showed that genetic differentiation among 4 groups was significant($P<0.01$). Genetic differentiation was not significant ($P>0.05$) between Zhanjiang and Qionghai, Xiamen and Pingtan groups, while it was significant($P<0.01$) between Zhanjiang and Xiamen, Zhanjiang and Pingtan, Qionghai and Xiamen, Qionghai and Pingtan groups. Distance may be the main reason of genetic differentiation. High gene flow, low genetic distance and no geographical clade in both haplotype network and phylogenetic tree indicate low genetic differentiation among groups. (3) Haplotype network shows there are two possible ancestor groups of *Chiloscyllium plagiosum*. Xiamen group has a tendency to generate its genetic traits. The lowest genetic diversity suggest that the protection of *Chiloscyllium plagiosum* in Zhanjiang is exigent. (4) The genetic differentiation of *Chiloscyllium plagiosum* was almost agreement with distance-isolation model. For supervising, Qionghai and Zhanjiang can be one geographical unit, Xiamen and Pingtan can be another unit.

Keywords: Population Genetic ; Mitochondrial DNA; *Chiloscyllium plagiosum*

第一章 文献综述

1. 鱼类遗传多样性研究

1.1 遗传多样性的含义及重要意义

生物多样性是生物及其环境形成的生态复合体以及与此相关的各种生态过程的总和,它包括数以百万计的动物、植物、微生物和它们所拥有的基因以及它们与生存环境形成的复杂的生态系统。因此,生物多样性是一个内涵十分丰富的重要概念,包括 4 个层次:遗传多样性、物种多样性、生态系统多样性和景观多样性(马克平, 1993)。其中遗传多样性是生物多样性的中心环节。广义的遗传多样性是指地球上生物所携带的各种遗传信息的总和。这些遗传信息储存在生物个体的基因之中。因此,遗传多样性也就是生物遗传基因的多样性。任何一个物种或一个生物个体都保存着大量的遗传基因,因此,可被看作是一个基因库(Gene pool)。狭义的遗传多样性主要是指生物种内基因的变化,包括种内显著不同的种群之间以及同一种群内的遗传变异(世界资源研究所, 1992)。此外,遗传多样性可以表现在多个层次上,如分子、细胞、个体等。在自然界中,对于绝大多数有性生殖的物种而言,种群内的个体之间往往没有完全一致的基因型,而种群就是由这些具有不同遗传结构的多个个体组成。

遗传多样性代表生物种群内和种群间的遗传结构的变异。每一个物种包括由若干个体组成的若干种群。各个种群由于突变、自然选择或其他原因,往往在遗传上不同。因此,某些种群具有在另一些种群中没有的基因突变(等位基因),或者在一个种群中很稀少的等位基因可能在另一个种群中大量出现。这些遗传差别使得有机体能在局部环境中的特定条件下更加成功地繁殖和适应。不仅同一个种的不同种群遗传特征有所不同,即存在种群之间的基因(遗传)多样性;在同一个种群内也存在基因(遗传)多样性,即在一个种群中某些个体常常具有基因突变。这种种群内的基因(遗传)多样性就是进化材料。具有较高基因(遗传)多样性的种群,可能有某些个体能忍受环境的不利改变,并把它们的基因传递给后代。环境的加速改变,使得遗传多样性的保护在生物多样性保护中占据着十分重要的地位。

生物多样性是地球经过 40 多亿年的自然演化而形成的,是地球上最宝贵的

自然资源，不但给人类社会提供了丰富的食物、药物和一部分工业原料，而且在水土保持、调节气候、维持生态平衡等方面起着举足轻重的作用，表现为经济效益、社会效益和生态效益三者的高度统一，成为人类社会持续发展的支持系统。因此，遗传多样性是生物多样性的基础及核心，对其有效的保护可促进整个人类社会健康有序地发展。

1.2 遗传多样性的研究方法

随着遗传多样性研究的发展，遗传多样性的检测手段日益成熟和多样化，可从不同角度和层次来揭示物种的变异性。其中，遗传标记是非常重要的，它的发展过程可分为4 种类型：形态标记、细胞标记、生化标记和分子标记。

1.2.1 形态学方法

形态学方法，又称生物测定学方法，属于传统的鉴别方法。形态标记(morphological marker)是指利用生物体一些常见的形态学性状（如长度、高度、重量、颜色等）对某种生物的遗传多样性进行分析，是生物特定的肉眼可见的外部特征特性，是简单直观，容易获得的指标。从形态学或表型性状上研究遗传变异是最古老、最简便易行的方法。形态学性状是一些表型性状，通常利用的表型性状有两类，一是符合孟德尔遗传规律的单基因性状，包括可量性状、质量性状、稀有突变等，另一类是由多基因决定的数量性状。通过对这些表型性状进行观察、测量、计数和统计，可以检测种内或种间的遗传多样性，具有取样方便、操作简单、易于分析等优点。采用严密的数量遗传学方法，就可以在短期内对所研究的物种的遗传变异有一个基本认识。但由于表型和基因型之间存在着基因表达、调控、个体发育等复杂的中间环节，如何根据表型上的差异来反映基因型上的差异就成为用形态学方法检测遗传变异的关键。而且由于可利用的形态学标记数量有限，表型特征受环境影响较大，所以只用形态学方法不能客观地度量遗传变异的大小（夏铭，1999）。由自然突变或物化诱变均可获得具有特定形态特征的材料，但所需时间长，并且可能同时诱变产生不利的重要性状。形态学方法缺点是数量较少，遗传表达有时不太稳定，易受环境条件及基因显隐性的影响。

1.2.2 细胞学标记

细胞遗传学的研究发现，染色体数目的变化，如单体，三倍体和结构的变化

如缺失, 重复, 倒位, 易位等, 常常引起表型性状的变异, 因此染色体的变化可以作为一种遗传标记, 用于测定基因所在的染色体和位置。通过建立染色体核型和带型分析技术可鉴别宏观物种的分类及核型演化。核型是指把动植物、真菌等的某一个体或某一分类群的体细胞内整套染色体显微摄影后再放大照片, 按照染色体相对长度、臂指数、着丝粒指数、染色体臂数等 4 个参数将所有染色体作系统排列, 可代表一个物种的染色体特征。染色体分带技术是将某物种染色体制片用不同物化手段处理, 再用不同染料染色, 在荧光激发下染色体臂会显示出不同的带数, 如 G 带(Giemsa banding), C 带(Constitutive heterochromatin banding), N 带(Nucleolar organizer region banding) 等, 可用于明确鉴别许多物种核型中的任一条染色体。鱼类细胞遗传学中的研究显示鱼类拥有一些特殊的核型特征 (Andreatta *et al.*, 1993), 均表现了鱼类在染色体水平上的多态性。此外, 染色体结构变异, 如缺失、易位, 非整倍体如缺体、单体、三体等都各有其特定的细胞学特征, 也可作为一种细胞标记。近几年, 由细胞学方法和分子杂交技术相结合发展起来的荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH), 使得染色体变异的研究有了重大突破 (邱芳等, 1998; 权洁霞和戴继勋, 1999)。染色体变异研究对于研究生物系统分类、起源与进化有重要意义, 它克服了形态标记易受环境影响的缺点 (Andreatta *et al.*, 1993)。目前已报道染色体的鱼类已达 2000 种左右 (耿德贵等, 1999), 绝大部分为淡水种类, 受取样等原因影响海水鱼类相关研究较少。

但是, 细胞标记的研究需要大量的人力和时间, 并且一些物种对染色体数目和结构变异反应敏感, 或适应此种变异的能力较差, 难以获得标记材料, 从而限制了细胞学标记的应用。

1.2.3 生化标记

60 年代初出现了同工酶标记。可从蛋白质水平来反映生物的遗传变异。同工酶是指具有同一底物专一性的不同分子形式的酶, 具有组织、发育及物种的特异性。其基本原理是根据电荷性质的差异, 因此通过蛋白质电泳或色谱技术和专门的染色反应显示出同工酶的不同形式, 从而鉴别不同基因型。由于其经济方便, 易于操作, 生化标记受到广泛应用, 特别在品种质量和纯度鉴定以及动植物群体遗传结构研究中已成为常规操作。但实验结果会随着发育时期、器官及环境的变

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库